

L. Castaño, J.R. Bilbao, B. Calvo

An Esp Pediatr 1997;47:201-206.

Introducción

En los capítulos anteriores, se ha realizado una revisión de la terminología y aspectos teórico-prácticos de los métodos comúnmente utilizados en el análisis molecular de patologías genéticas. Así, en los *capítulos 1 a 4*, se han descrito los conceptos generales y los métodos básicos de la Biología Molecular. En el *capítulo 5* se inició el análisis de la aplicación práctica de todos estos conceptos mediante el estudio de casos clínicos y siguiendo este orden, en este capítulo continuaremos con la descripción de otro caso clínico de origen genético, así como con el planteamiento de estudio de un polimorfismo genético, como ejemplo de la aplicación de estas tecnologías en la práctica clínica habitual.

Caso clínico

Breve historia clínica

Niño de 3 años con síntomas de poliuria (>5 L/día) y poli-dipsia. El estudio de parámetros bioquímicos y pruebas de restricción hídrica, concluyen con el diagnóstico de diabetes insípida de origen central o neurogénica. En los antecedentes destacan distintos familiares (madre, tío paterno y prima) con cuadro clínico similar y diagnóstico de diabetes insípida.

Objetivo del estudio

Identificar el trastorno genético molecular de la diabetes insípida central en esta familia.

Planteamiento del estudio genético y resultados del análisis molecular

1.- Conocimiento de la estructura del gen responsable de la enfermedad

La diabetes insípida central es una enfermedad caracterizada por la incapacidad de los pacientes afectados para mantener el equilibrio hídrico, debido a una deficiencia total o parcial de hormona antidiurética (ADH) o arginina vasopresina (AVP). La forma familiar (diabetes insípida central familiar o FNDI) es poco frecuente y su transmisión suele ser autosómica dominante. La mayoría de los casos conocidos de FNDI se asocian con un

Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (6): Caso clínico: Trastorno molecular en la diabetes insípida central. Análisis de un gen polimórfico: Tipaje HLA

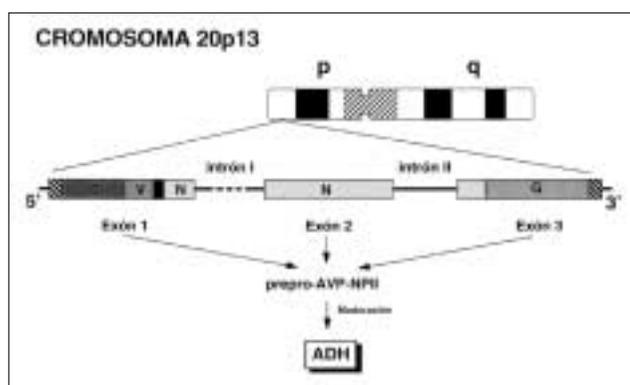


Figura 1. Estructura del gen de la arginina vasopresina - neurofisina II (AVP-NPII). Su producto es la prepro-hormona (prepro-AVP-NPII) que tras un proceso de maduración se convierte en la forma activa circulante (ADH o AVP). S: péptido señal; V: ADH; N: Neurofisina II; G: glicopéptido terminal; p: brazo corto del cromosoma 20; q: brazo largo.

trastorno en el gen de la ADH.

El gen de la arginina vasopresina-neurofisina II (AVP-NPII) localizado en el cromosoma 20p13, es el encargado de codificar la ADH. Este gen (Fig. 1) está formado por tres exones; el primero codifica el péptido señal, los nueve aminoácidos que componen la ADH y el comienzo de la neurofisina (NPII); la región que codifica la NPII continúa en el segundo exón y finaliza en el exón 3, en el que se produce además el glicopéptido terminal. El producto del gen constituye la molécula precursora (prepro-AVP-NPII) que, tras un proceso de maduración, resulta en la forma activa circulante de la hormona (ADH).

2.- Estudio genético: análisis moleculares

Estudios anteriores en el gen AVP-NPII han permitido identificar, en varias familias independientes, algunas mutaciones responsables de la enfermedad. En la mayor parte de los casos se trataba de mutaciones puntuales. Por este motivo y debido al pequeño tamaño del gen y al reducido número de exones, se plantea utilizar como método de estudio la **secuenciación directa** del mismo. En casos en los que el tamaño del gen o número de exones fuera más grande, o bien el número de personas o casos clínicos fuera mayor, podría inicialmente plantearse un método de screening para detectar algún cambio de nucleótido (o mutación) en algún exón, mediante un método de SSCP (po-

Unidad de Investigación, Departamento de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo, Vizcaya.

Correspondencia: Dr. Luis Castaño. Unidad de Investigación, 2ª planta Edif. Anatomía Patológica. Hospital de Cruces, Plaza de Cruces s/n, 48903 Barakaldo, Vizcaya.



Figura 2. Planteamiento de estudio del gen AVP-NP11.

limorfismos de conformación de ADN de cadena sencilla) o DG-GE (electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante), etc., para luego secuenciar exclusivamente el exón presuntamente alterado (véase cap. 4).

2.1. Recogida de muestras y amplificación del gen

Como se vio en capítulos anteriores, el tejido más accesible para la extracción de ADN genómico es la sangre periférica, siempre que la alteración se suponga en línea celular germinal. Así, se procede a una extracción de sangre (anticoagulada con EDTA) del paciente y del resto de los miembros de la familia (Fig. 2).

Tras la extracción del ADN por los métodos habituales (véase cap. 2), se procede a la amplificación selectiva del gen AVP-NP11 mediante la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* o *Reacción en Cadena de la Polimerasa*, véase cap. 3).

La amplificación del gen consiste en la amplificación de sus tres exones. Con objeto de evitar la amplificación de las dos regiones no codificantes (intrones) que separan los tres exones, se utilizan *primers* o cebadores que flanqueen exclusivamente los exones. Así, se procede al diseño de 3 parejas de *primers* (dos para cada exón), y se ponen a punto las condiciones de las tres reacciones de PCR.

Los productos amplificados se visualizan por electroforesis en gel de agarosa (cap. 3). En este caso se obtuvieron tres fragmentos de 345 pb (exón 1), 337 pb (exón 2) y 327 pb (exón 3) que posteriormente se sometieron a secuenciación directa (Fig. 2).

2.2. Secuenciación directa automática de cada uno de los exones amplificados

En el capítulo 5 (Fig. 5 del mismo) se vio la secuenciación directa de un gen por métodos clásicos. En ese caso, la lectura

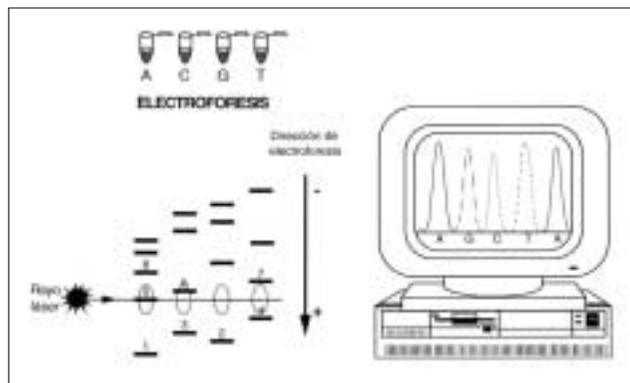


Figura 3. Esquema de la secuenciación directa automática. 1,2,3,4,5,..... es la dirección de lectura de nucleótidos por el rayo láser. Véase explicación en el texto.

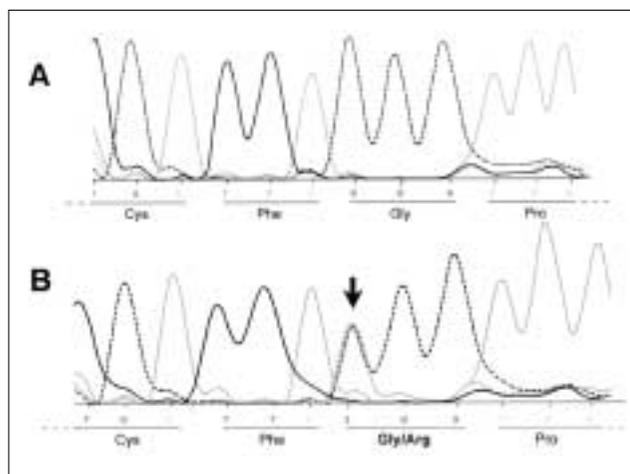


Figura 4. Fragmento de la secuencia de nucleótidos obtenida por secuenciación automática del gen AVP-NP11. A: Secuencia normal. B: Secuencia con mutación puntual en heterocigosis (“GGG” pasa a “CCC” y cambia el aminoácido *glicina* (Gly) por *arginina* (Arg). “C”, “G” y “T” representan los nucleótidos citosina, guanina, y timina, respectivamente. “S” es la representación de dos nucleótidos “C/G”, es decir, citosina/guanina.

de las bandas de la imagen de autorradiografía nos permitía conocer la secuencia de nucleótidos de un gen normal y compararla con la obtenida en un gen mutado.

La automatización del proceso de secuenciación con el desarrollo de los secuenciadores automáticos ha reducido de manera considerable la laboriosidad de la técnica, permitiendo la obtención de resultados en un tiempo mínimo y el abandono de los productos radiactivos.

Un secuenciador automático permite la detección de moléculas de ADN marcadas con fluorescencia y separadas por electroforesis (Fig. 3). La diferencia básica de este método respecto al tradicional de Sanger (véase cap. 4) es el empleo de un *primer* o cebador de secuenciación marcado con fluorescencia en su extremo 5'. Las cuatro reacciones de polimerización (una para cada nucleótido A, C, G, T) se someten a electroforesis en

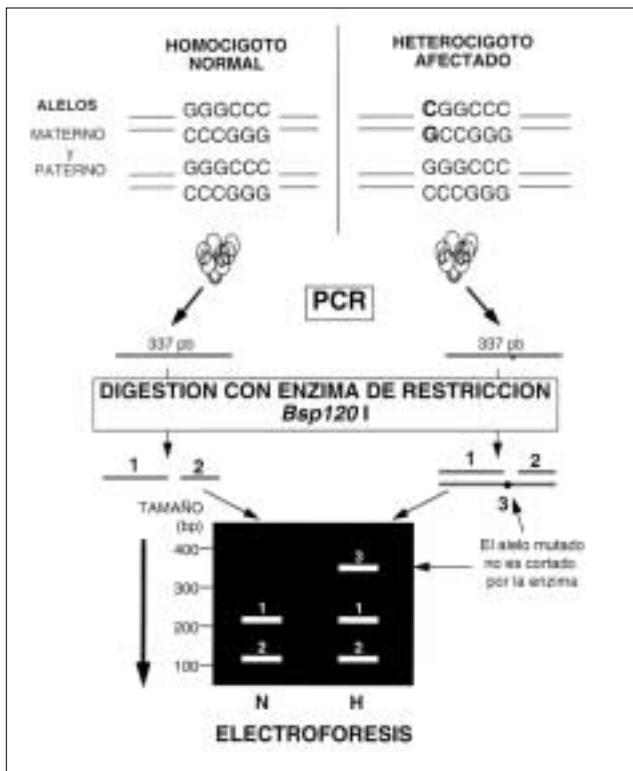


Figura 5. Esquema gráfico de la técnica PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo en los fragmentos de restricción) para una mutación puntual que destruye un lugar de restricción (*Bsp 120I*) en el gen AVP-NPII. N: individuo normal. H: individuo heterocigoto para la mutación.

cuatro calles adyacentes del gel (otro tipo de secuenciadores automáticos permiten cargar las cuatro reacciones en el la misma calle). Los fragmentos fluorescentes de cada calle migran a través del gel y son detectados a su paso por el rayo de láser (Fig. 3). La luz del láser excita las moléculas fluorescentes del *primer* o cebador, y las señales resultantes son recogidas y almacenadas en un ordenador (en forma de picos de diferentes colores, uno por cada uno de los cuatro nucleótidos).

En la figura 4 se pueden observar los resultados obtenidos de la secuenciación del exón 2 del gen AVP-NPII en uno de los pacientes (Fig. 4B), comparada con la secuencia normal de uno de los miembros no afectados de la familia (Fig. 4A). Como se ha comentado anteriormente, el trastorno es autosómico dominante, lo que implica la existencia de heterocigosis (un alelo alterado y otro normal). El análisis de los padres muestra que el alelo alterado es el materno. La sustitución puntual de una *guanina* “G” por una *citocina* “C” resulta en un cambio del aminoácido *glicina* “Gly” por *arginina* “Arg”, lo que constituye una “**mutación de sentido erróneo**” (*missense mutation*) (véase *cap. 2*) que provoca un cambio en la proteína sintetizada por el gen mutado cuya consecuencia es, en este caso, el desarrollo de la diabetes insípida.

2.3. Confirmación de la mutación por la técnica PCR-RFLP

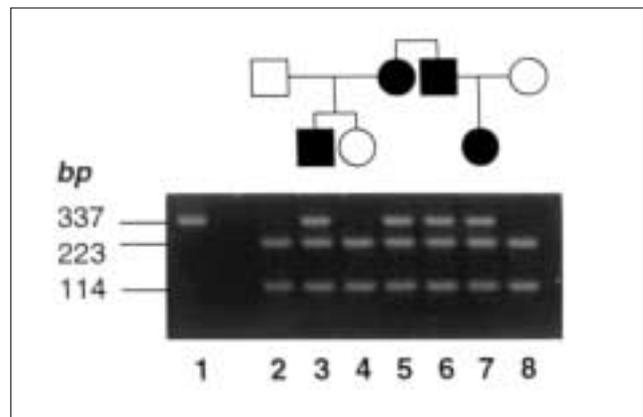


Figura 6. Patrón de fragmentos de restricción del exón 2 del gen AVP-NPII en la familia estudiada. Calle 1: fragmento del exón 2 sin digerir con el enzima (control). Calles 2, 4 y 8: Individuos normales. Calles 3, 5, 6 y 7: Pacientes afectados de diabetes insípida. Véase explicación en el texto.

Ante el hallazgo de una mutación puntual y para descartar errores técnicos en las maniobras de secuenciación, es importante su confirmación si es posible, por otros métodos (Figs. 5 y 6). En este caso, se confirma la mutación por PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa y polimorfismo en los fragmentos de restricción).

El conjunto de **lugares de restricción** (o sitios de corte del ADN por las enzimas de restricción) que tiene un gen (**mapa de restricción** de ese gen) varía en función de su secuencia de nucleótidos (véase *cap. 3*).

Como se observa en las figuras 5 y 6, el gen normal posee una secuencia de seis nucleótidos “GGG CCC” que constituye un lugar de restricción para el enzima *Bsp 120 I*, el cual desaparece en el gen mutado (“CGG CCC”). De este modo, la digestión del exón 2 (337 pb) con el enzima *Bsp 120 I* resulta en dos fragmentos de 223 y 114 pb (alelo normal) mientras que el alelo mutado no se puede cortar y aparece en la electroforesis como una banda de 337 pb.

Todas las personas afectas de la familia muestran tres bandas: una de 337 pb (correspondiente al alelo mutado) y otras de 223 y 114 pb (del alelo normal) pues, como ya se ha comentado, esta mutación aparece en heterocigosis (Figs. 5 y 6).

Análisis de un gen polimórfico: Tipaje HLA

En algunas ocasiones, se dice que un gen determinado es **polimórfico**, es decir, presenta diferentes variantes (alelos) en la población, todas ellas normales. En general, suelen ser conocidas las diferencias de secuencia de nucleótidos que caracterizan cada alelo, por lo que es posible diseñar métodos de estudio o tipaje basados en algunas de las técnicas descritas en capítulos anteriores.

Un ejemplo clásico de genes muy polimórficos son los que codifican para las moléculas HLA del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. Las moléculas HLA son proteínas de la membrana celular que están implicadas en la presentación de

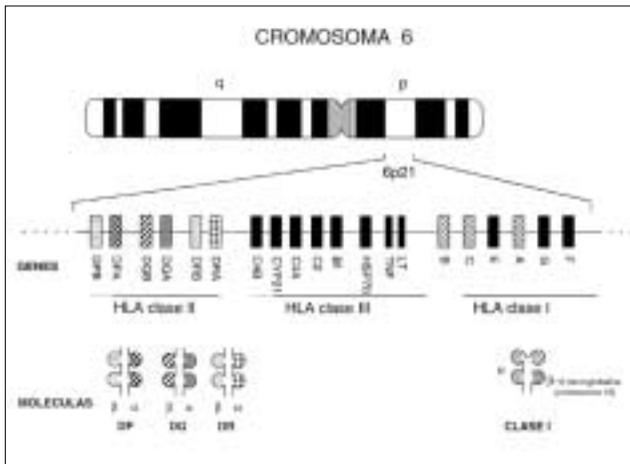


Figura 7. Posición de los distintos genes del sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6, y representación esquemática de las proteínas codificadas.

antígenos al sistema inmune. Los genes que codifican las moléculas del sistema HLA se encuentran en el brazo corto del cromosoma 6 (6p), y son muy polimórficos (Fig. 7). Su estudio es una práctica habitual en muchos centros hospitalarios, fundamentalmente por su importancia en trasplantes, pero también por su asociación a determinadas enfermedades autoinmunes (enfermedad celiaca, diabetes insulino-dependiente, ...). Clásicamente, el estudio de los distintos HLA de un individuo se ha realizado mediante técnicas serológicas, identificándose los diferentes subtipos proteicos. Más recientemente, el conocimiento de la secuencia de los genes que codifican para estas moléculas ha posibilitado la aplicación de técnicas de Biología Molecular en el tipaje, pudiéndose en la actualidad realizar subtipajes más específicos y precisos.

A modo de ejemplo de estudio de polimorfismos, presentaremos algunas de las técnicas moleculares que pueden aplicarse al tipaje HLA, concretamente al gen *DQB* (que codifica las subunidades β de las moléculas DQ de clase II) que es muy polimórfico (Fig. 7).

Conocimiento del gen a estudiar

Las moléculas HLA-DQ están formadas por dos subunidades proteicas (alfa y beta), codificadas por los genes *DQA* y *DQB*, respectivamente. El gen *DQB* se encuentra en el cromosoma 6p (brazo corto), y es muy polimórfico: presenta muchas variantes alélicas, que se diferencian por pequeños cambios en la secuencia de ADN (y consecuentemente en los aminoácidos de la proteína codificada). En lo que se refiere a la terminología, hoy en día las variantes se asignan mediante un código de cifras, precedido por el nombre del gen; por ejemplo *DQB1*0301*, *DQB1*0602*, etc. Tratándose de un gen autosómico, (se encuentra en un cromosoma autosómico) cada individuo es portador de dos copias del mismo (materna y paterna), y puede presentar en ambas copias el mismo alelo (homocigoto) o alelos diferentes (heterocigoto). El tipaje supone conocer qué combinación de

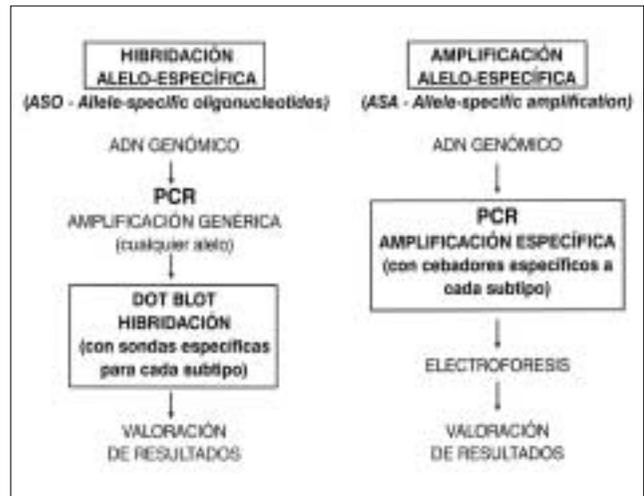


Figura 8. Esquema de dos estrategias alternativas a la secuenciación para el tipaje del gen *DQB*.

alelos (subtipos) presenta el individuo estudiado. Si alguno de los lectores está familiarizado con el tipaje HLA, los próximos párrafos tal vez le parezcan excesivamente simplificados, pero no es nuestra intención presentar un protocolo de tipaje HLA, sino más bien un razonamiento para la identificación de polimorfismos alélicos que pueden ser utilizados para éste u otros muchos genes polimórficos.

Tecnología aplicable al estudio

Como en todos los casos de estudio molecular, una técnica utilizable en el tipaje del gen *DQB* es su secuenciación en cada individuo, pero la laboriosidad de dicha técnica, y el hecho de que los alelos (y su secuencia) ya son conocidos, permite utilizar otras técnicas indirectas. Así, en este capítulo presentaremos dos posibilidades de estudio que utilizan como base el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): la **PCR-ASO (PCR - Allele-specific oligonucleotide)** basada en **hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos**, y la **PCR-ASA (Allele-Specific Amplification - PCR)** o **PCR alelo-específica**, en la que se amplifican solo aquellos subtipos presentes en el individuo (Fig. 8). Ambos métodos han sido descritos en los capítulos 3 y 4.

1.- PCR-ASO: Hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos

Esta técnica es la más utilizada hoy en día para el tipaje de especificidades HLA. Como se describe en las figuras 8 y 9, el gen *DQB* de cada individuo a estudiar se amplifica por PCR, con el fin de tener material suficiente de ese gen. Para ello, se utilizan cebadores o *primers* que corresponden a una **región conservada** del gen *DQB* (aquella zona de un gen que tiene la misma secuencia en todos los alelos) de manera que se asegura la amplificación de cualquiera de los alelos. El ADN amplificado se deposita, en formato *dot blot*, sobre una membrana de nylon, para su hibridación con sondas marcadas (véase cap. 3). En el

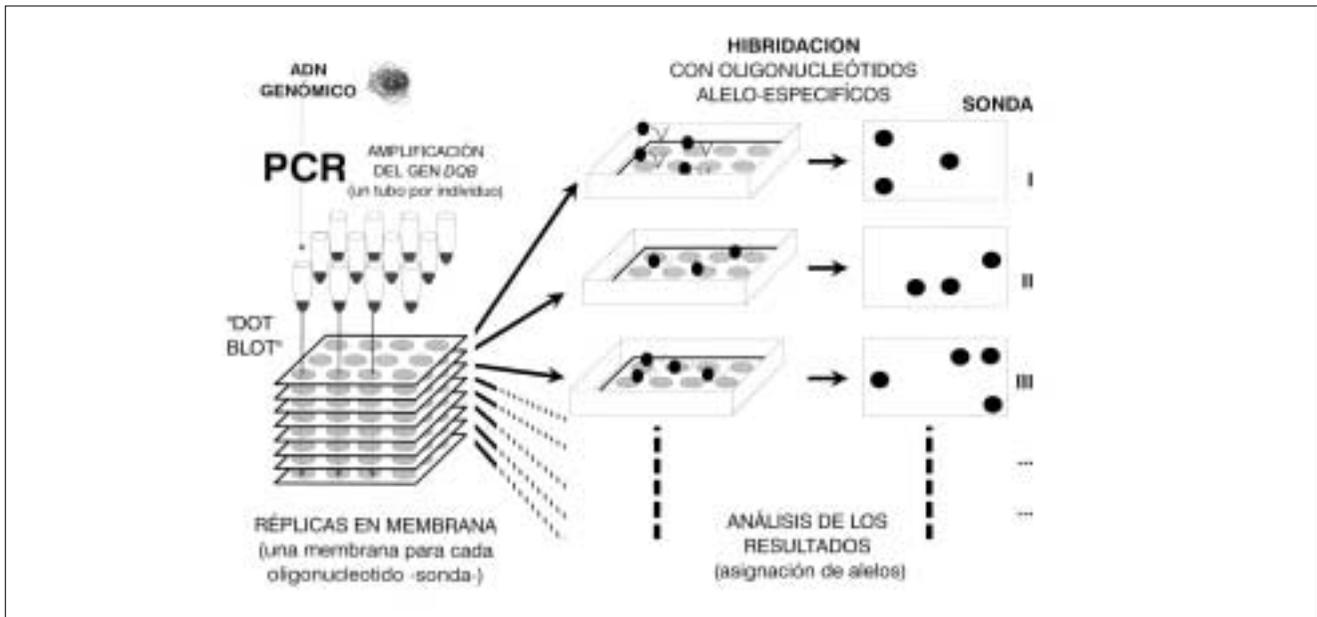


Figura 9. Representación esquemática de un experimento de *PCR-ASO* para el tipaje de los subtipos del gen *DQB*. El ADN de cada individuo es amplificado por PCR con cebadores comunes a todos los alelos de *DQB*, y el producto de amplificación se deposita en membranas de nylon, en formato *dot blot* (véase cap. 3). Se realizan 20 réplicas de esta membrana, y cada una de ellas se hibrida con una sonda (oligonucleótido alelo-específico) diferente. La combinación de sondas para la que la muestra es positiva, determinará los subtipos del individuo analizado.

caso del gen *DQB*, el ADN amplificado de cada individuo se reparte en 20 membranas (igual al número de sondas que se van a utilizar) (Fig. 9). Cada una de estas membranas, en la que se puede depositar ADN de hasta 96 individuos, se incuba con una de las **sondas ASO** (oligonucleótidos correspondientes a regiones polimórficas -variables-) del gen *DQB*, de forma que se hibridarán al ADN depositado en la membrana solo si esa variante polimórfica está presente. Una vez reveladas todas las pruebas, se analizan los resultados; la combinación de sondas para las que una muestra hibrida positivamente nos dará los dos alelos presentes en ese ADN genómico (Fig. 10). La mayor ventaja de esta técnica estriba en la posibilidad de tipar en poco tiempo un gran número de muestras. No obstante, debido a un cierto nivel de reacción cruzada que existe entre las diferentes sondas ASO, la interpretación de los resultados no es siempre sencilla, y se precisa de personal experimentado en el HLA. Se están identificando nuevos tipos y subtipos continuamente, de forma que la cantidad de sondas a utilizar y la complejidad del análisis es cada vez mayor, hasta el punto de que existen equipos informáticos capaces de asignar los “subtipos más probables” a partir de los resultados del dot blot.



Figura 10. Patrones de hibridación positiva de cada una de las especificidades *DQB* con cada una de las sondas (I-XX). Así, por ejemplo, una muestra positiva para la sonda **I**, poseerá el alelo 0501, 0502 ó 0503. Si además presenta hibridación positiva con la sonda **III**, se trata necesariamente del subtipo 0502, descartándose los otros dos.

2.- PCR-ASA: Amplificación alelo-específica

Esta técnica, descrita en el capítulo 4, es una alternativa a la anterior, que omite el paso de la hibridación debido a que la amplificación por PCR se realiza utilizando cebadores correspondientes a la región polimórfica (variable) del gen (Fig. 11). En el caso del gen *DQB*, se realizan 9 reacciones independientes de PCR para cada muestra de ADN a tipar. En cada una de ellas se

incluye una pareja de cebadores: uno común a todos los subtipos (corresponde a una región conservada) y el otro específico de uno de los polimorfismos (Fig. 11). Como es de esperar, sólo se producirá amplificación en aquellas reacciones de PCR en las que los cebadores coincidan con los polimorfismos presentes en la muestra de ADN genómico. Los resultados se pueden observar en un gel de agarosa, y así asignar los subtipos corres-

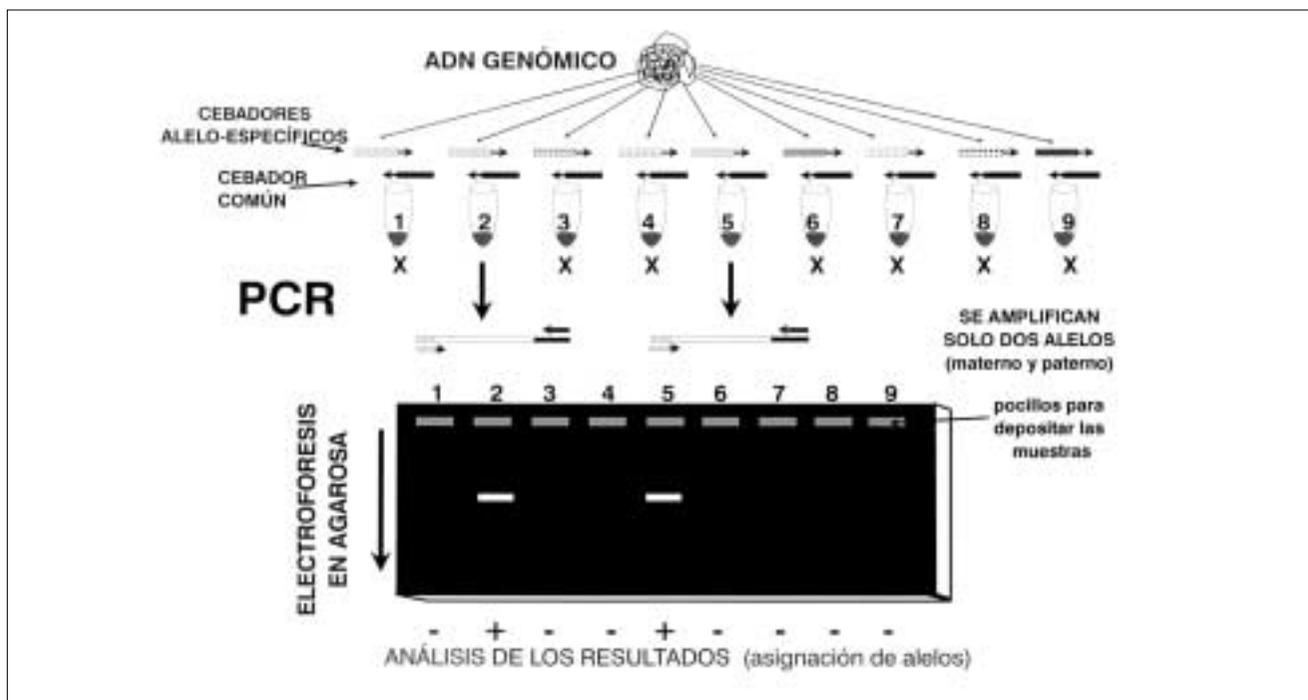


Figura 11. Esquema de un experimento de tipaje del gen *DQB* por el método PCR-ASA. Se montan nueve reacciones de PCR para cada muestra a analizar y en cada una de ellas se incluye un cebador específico para un único alelo (que corresponde a una región polimórfica o variable del gen) y otro cebador común a todos los alelos (correspondiente a la región conservada). En la comprobación de las amplificaciones en gel de agarosa, se observa que solo dos de ellas han funcionado: aquellas cuya secuencia corresponde a los cebadores específicos. El resultado nos indica los dos alelos presentes en esa muestra.

pondientes. De nuevo, esta técnica también presenta problemas de reacciones cruzadas entre cebadores, y la experiencia del analista es importante.

Cada laboratorio que se dedica a tipar estos polimorfismos suele diseñar su propia estrategia, que puede incluir alguna de estas técnicas, ambas, o una combinación de amplificaciones e hibridaciones o incluso secuenciación, dependiendo de la exactitud con la que sea necesario conocer los subtipos en cada caso.

En resumen, este tipo de planteamientos técnicos pueden utilizarse para identificar los diferentes alelos de genes polimórficos, como el caso del HLA. Además, no hay que olvidar que también puede utilizarse esta metodología para detectar de forma rápida mutaciones ya conocidas, en genes responsables de patologías. En estos últimos casos se construirían oligonucleótidos con la mutación incorporada en su secuencia, para utilizarlos como sonda de hibridación en el caso de la técnica PCR-ASO, o se diseñarían *primers* o cebadores con la mutación en su secuencia, para amplificar solo aquellos alelos que presenten la mutación, en el caso del método PCR-ASA.

Bibliografía

- 1 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (1): Conceptos básicos. *An Esp Pediatr* 1996;**45**: 315-320.
- 2 Castaño L, Bilbao JR, Urrutia I. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (2): Purificación de ácidos nucleicos. *An Esp Pediatr* 1996;**45**: 541-546.
- 3 Castaño L, Bilbao JR, Calvo B. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (3): Enzimas de Restricción. Reacción en cadena de la polimerasa. Formas de estudio de mutaciones. *An Esp Pediatr* 1997;**46**: 87-92.
- 4 Castaño L, Bilbao JR. Introducción a la biología molecular y aplicación a la pediatría (4): Estudio de mutaciones en ADN amplificado por PCR. *An Esp Pediatr* 1997;**46**: 305-310.
- 5 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. New York, 1989.
- 6 Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J, Struhl K. *Current protocols in molecular Biology*. Ed. J. Wiley & Sons, 1st Ed., 1994.